

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Zürich
Direktor: Prof. Dr. E. WIESMANN
Arbeit unter Leitung von Prof. Dr. J. LINDENMANN

Präzipitierende Leber-Autoantikörper bei der Maus

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen
Fakultät der Universität Zürich

vorgelegt von
GONDINI FRAVI
von Andeer/Gr

Genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. J. LINDENMANN

Zürich 1968



BASEL (Schweiz)

S. KARGER

NEW YORK

Besonders danken möchte ich Herrn Prof. Dr. *J. Lindenmann* für die Überlassung des Themas und die Anleitung während der Ausarbeitung. Ferner bin ich Frau Dr. *M. Acklin* für ihre Mithilfe bei den Tierversuchen, Fräulein *A. Brunet* für die Unterstützung bei den Laborarbeiten, Fräulein *M. Schaich* für die Anfertigung der Photographien und Fräulein *R. Leemann* für die Niederschrift des Manuskriptes zu Dank verpflichtet.



Immunisiert man Individuen einer Spezies mit Extrakten, die aus Organen einer andern Spezies gewonnen wurden, so werden häufig Antikörper induziert, die nicht nur mit den zur Immunisierung verwendeten Organextrakten, sondern darüber hinaus auch mit Organextrakten anderer Tierarten und sogar mit Organextrakten des den Antikörper liefernden Tieres reagieren. Man spricht in solchen Fällen von Autoantikörpern, und als klassisches Beispiel dafür gilt die Immunisierung mit Linsenproteinen, wie sie von *Uhlenhuth* [9] durchgeführt wurde.

Interessanterweise lassen sich Autoantikörper in der Regel nur mit Organextrakten einer fremden, nicht mit Organextrakten der gleichen Spezies induzieren. So sagt zum Beispiel *Witebsky* [11]: «If an animal forms organ-specific autoantibodies in response to hetero-immunization, it might all the more be expected that such antibodies would be formed following immunization with organs derived from the same species. This, however, is not the case; rabbits injected intravenously with fresh lens or brain preparations of rabbit origin fail to form antibodies.» Beim Immunisieren mit Material der gleichen Spezies kommen vorwiegend alloantigene (frühere Nomenklatur: isoantigene) Unterschiede zur Geltung. So erhält man beispielsweise bei Immunisierung gewisser Stämme von Inzuchtmäusen mit dem Gammaglobulin anderer Mäusestämme Antikörper gegen Gammaglobulinvarianten innerhalb der Spezies Maus, und diese Varianten heißen sinngemäß Allotypen. Ähnlich verhält es sich bei Immunisierung mit geformten Blutelementen: Die Alloantigene der Erythrozyten führen zur Einteilung in Blutgruppen. Auch die Immunisierung mit Transplantaten

führt zur Erkennung alloantigener Unterschiede, die man als Histokompatibilitätsantigene bezeichnet.

Analog würde man nun erwarten, daß die Immunisierung mit Organextrakten der gleichen Spezies den Nachweis im Gewebe lokalisierter, extrahierbarer Alloantigene gestatten würde. Doch sind solche wasserlösliche Gewebe-Alloantigene bisher nur vereinzelt bekanntgeworden. Vielleicht hängt das damit zusammen, daß man auf die Suche solcher Alloantigene erst wenig Energie verwendet hat. Möglicherweise liegt die Schwierigkeit aber darin, daß bei Immunisierung mit Organextrakten der gleichen Spezies entweder überhaupt keine oder dann vorwiegend Autoantikörper gebildet werden. So haben *Shulman et al.* [6] bei Immunisierung von Kaninchen mit Extrakten aus den Anhangdrüsen des männlichen Geschlechtsapparates von Kaninchen bei einigen Tieren Autoantikörper induzieren können, während die zu erwartenden alloantigenen Unterschiede nicht zur Geltung kamen.

Diese Untersuchungen an Kaninchen sind insofern schwer zu deuten, als keine Inzuchttiere verwendet wurden. Eine Spezies wie die Maus, bei der zahlreiche Inzuchtstämme vorliegen, eignet sich für die Untersuchung der Beziehungen zwischen Induktion von Allo- und Autoantikörpern viel besser. Bei der Maus ist von früheren Untersuchungen her die Existenz mindestens eines löslichen Gewebe-Alloantigens bekannt, des ϵ -Alloantigens [3, 5].

Allerdings waren zur Erzeugung der entsprechenden präzipitierenden Alloantikörper ungewöhnliche Methoden notwendig: Der Antikörper fand sich bisher ausschließlich bei A2G-Inzuchtmäusen, die mittelst Virus-Onkolyse gegen Ehrlich-Ascites-Tumor immunisiert und durch Prüfinjektion ('challenge') mit 10^6 — 10^7 lebenden Tumorzellen hyperimmunisiert worden waren. Mit den so erhaltenen präzipitierenden Antiseren ließen sich in einfachen Gelpräzipitationstesten eine größere Zahl von Inzuchtmäusen auf Anwesenheit bzw. Abwesenheit des ϵ -Alloantigens in den Geweben prüfen. So erwies sich, daß beispielsweise die Stämme A, A2G, C3H und CBA ϵ -negativ, die Stämme BALB/c, C57BL/6 und DBA/2 ϵ -positiv reagierten.

Wir stellten uns zunächst die Frage, ob es möglich wäre, präzipitierende ϵ -Alloantikörper unter Umgehung der Virus-Onkolyse zu erhalten, nämlich durch direkte Immunisierung ϵ -negativer Mäuse mit Organextrakten ϵ -positiver Mäuse. Als Organextrakt wählten wir willkürlich die Leber, weil wir aus der Leber relativ

einfach viel Material gewinnen konnten. Zu unserem Erstaunen sahen wir aber in keinem Fall die Bildung des erwarteten Anti- ϵ -Alloantikörpers. Stattdessen ergab sich, daß bei gewissen Kombinationen zwischen Stamm der immunisierten Mäuse und Stamm der das immunisierende Antigen spendenden Mäuse präzipitierende Autoantikörper mit weitgehender Organspezifität auftraten. Die vorliegende Arbeit schildert die Gesetzmäßigkeiten, die im Zusammenhang mit diesem leberspezifischen Autoantikörper beobachtet werden.

Material und Methoden

Mäuse

Die Mäusestämme wurden am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Zürich in Bruder-Schwester-Inzucht gehalten. Die Zuchtkerne waren 1965 beschafft worden, und zwar für A, A2G, BALB/c, CBA und C3H aus dem Laboratory Animals Centre, Carshalton, Surrey, England, und für C57BL/6 aus dem Zentralinstitut für Versuchstierzucht, Hannover-Linden, Bundesrepublik Deutschland. In einem Versuch immunisierten wir CBAfCFW/Lac-Mäuse, die kurz vorher aus Carshalton bezogen worden waren. F_1 -, F_2 - und Rückkreuzungstiere wurden von uns gezüchtet. Alle Tiere waren zur Zeit der Immunisierung 6–26 Wochen alt.

Antigene

Zur Immunisierung verwendeten wir ausschließlich Extrakte aus Mäuselebern. Die Tiere wurden in Äthernarkose entblutet. Die Leber wurde entnommen, mechanisch zerkleinert, gewogen und mit dem gleichen Gewicht an Aqua dest. versetzt. Dieses Gemisch wurde zweimal tiefgefroren (-20°C) und aufgetaut und in einem «Servall Omnimix» bei maximaler Tourenzahl 2 Min. lang homogenisiert. Das Homogenat wurde 20 Min. bei 5500 U/Min. in einer Horizontal-Kühlzentrifuge bei $+2^\circ\text{C}$ zentrifugiert und der Überstand, wo im Text nichts anderes vermerkt ist, mit dem gleichen Volumen Chloroform geschüttelt. Nach nochmaliger Zentrifugation (wie oben) bildeten sich 3 Zonen: Eine untere Chloroformschicht, eine mittlere Grenzschicht und eine obere wäßrige Schicht. Die wäßrige Schicht wurde abpipettiert und diente als Antigen, das in kleinen Portionen bei -20°C bis zum Gebrauch aufbewahrt wurde.

In einem Versuch verwendeten wir als immunisierendes Antigen einen wie oben hergestellten Extrakt aus BALB/c-Lebern, die in gefrorenem Zustand vom Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA, erhalten worden waren.

In der Gelpräzipitation verwendeten wir auch andere wäßrige Organextrakte als Antigene; sie wurden in analoger Weise hergestellt.

Immunisierungsschema

Das Antigen wurde aufgetaut, mit dem gleichen Volumen von komplettem Freund'schen Adjuvans (Difco) versetzt und durch langes Schütteln emulgiert, bis ein kleiner Tropfen der Emulsion, auf eine Wasserfläche verbracht, nicht

mehr auseinanderlief. Die Mäuse erhielten in der Regel wöchentliche intraperitoneale Injektionen von 0,2 ml der Emulsion.

Blutproben wurden durch Orbitalpunktionen gewonnen, meist 6—7 Tage nach einer Antigeninjektion. Bei allen Stämmen regten 4—6 Injektionen regelmäßig die Bildung eines Ascites an. Wenn ein Ascites auftrat, wurde er periodisch punktiert. Antikörper, falls vorhanden, kamen im Serum und im Ascites in vergleichbarer Konzentration vor.

Gelpräzipitations-Test

Doppeldiffusions-Präzipitations-Teste und Immunelektrophorese wurden in 2 mm dicken Schichten von 1% Noble Agar (Difco) in 0.05 M Veronal-Acetat-Puffer pH 8.6 durchgeführt. Präzipitationslinien waren meist nach wenigen Stunden, spätestens nach 24 Stunden voll ausgeprägt.

Semiquantitativer Präzipitations-Test

2% Noble Agar, welcher durch Erhitzen flüssig gemacht worden war, wurde bis 45° C abgekühlt. Dazu wurde ein gleiches Volumen F-Antigen in geeigneter Konzentration gegeben. Dieser Antigen-Agar wurde in Petri-Schalen von 8,5 cm Durchmesser gegossen. Zur Testung der Antiseren wurden 9 Löcher von 4 mm Durchmesser im Abstand von 2,4 cm gestanzt und mit dem fraglichen Serum aufgefüllt. Die Konzentration von Antigen im Agar wurde so gewählt, daß die durch den Antikörper entstandenen Präzipitationshöfe zwischen 1½ und 4 mm groß wurden. Die gleiche Methode wurde von *Fahey* und *McKelvey* zur quantitativen Bestimmung der Immunoglobuline im Serum benutzt [2], wobei aber dem Agar Antikörper statt Antigen beigemischt war.

Resultate

1. Induktion eines präzipitierenden Autoantikörpers

In einem ersten Versuch wurden 10 CBA-Mäuse mit einem wäßrigen Extrakt aus BALB/c-Lebern und Freund's Adjuvans immunisiert (s. Material und Methoden). Sieben Tage nach der 5. wöchentlichen Antigeninjektion wurden erstmals individuelle Blutproben in einem Ouchterlony-Test gegen das zur Immunisierung verwendete Antigen geprüft. Zwischen jedem einzelnen Serum und dem Antigen trat eine deutliche und scharfe Präzipitationslinie auf. Die gleiche Linie bildete sich auch zwischen den Antiseren und Leberextrakten anderer Mäusestämme (Abb. 1). Die Leberextrakte sämtlicher von uns geprüfter Mäusestämme, sowohl ϵ -positiver wie ϵ -negativer, reagierten in gleicher Weise. Der neue präzipitierende Antikörper konnte demnach nicht identisch mit dem früher gefundenen Anti- ϵ -Alloantikörper sein, was auch im Ouchterlony-Test zur Geltung kam, wo der neue Antikörper und ein Anti- ϵ -Antikörper einander überschneidende Präzipitationslinien ergaben (s. Abb. 2).

Der neue Antikörper, den wir provisorisch Anti-F nennen wollen, reagierte auch mit Extrakten aus CBA-Lebern. Es schien sich demnach um einen Autoantikörper zu handeln. Um das zu beweisen, wurden einzelne Seren gegen den Extrakt der eigenen Leber geprüft. In allen Fällen fiel das Resultat positiv aus.

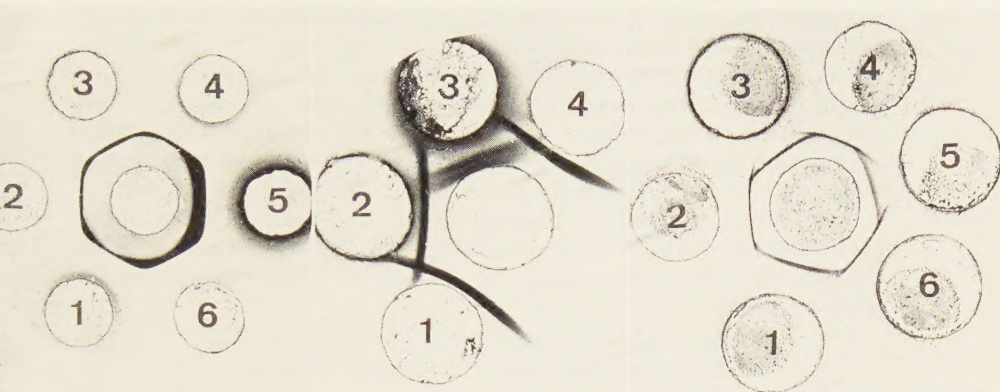


Abb. 1

Abb. 2

Abb. 3

Abb. 1. Reaktion des F-Antikörpers mit Leberextrakten von verschiedenen Mäuseinzuchtstämmen (F-Antikörper gewonnen von CBA-Mäusen).

Zentrum: F-Antikörper.
 Nr. 1: A-Leberextrakt.
 Nr. 2: A2G-Leberextrakt.
 Nr. 3: BALB/c-Leberextrakt.
 Nr. 4: CBA-Leberextrakt.
 Nr. 5: C3H-Leberextrakt.
 Nr. 6: C57BL/6-Leberextrakt.

Abb. 2. Reaktion von Mäuseleberextrakt (BALB/c) gegen F-Antikörper, ϵ -Antikörper und Antikörper von C57BL/6-Mäusen, welche mit CBA-Leberextrakt immunisiert worden waren.

Zentrum: BALB/c-Leberextrakt.
 Nr. 1: F-Antikörper.
 Nr. 2: ϵ -Antikörper.
 Nr. 3: Antikörper von C57BL/6-Mäusen.
 Nr. 4: F-Antikörper.

Abb. 3. Reaktion des F-Antikörpers mit Leberextrakten verschiedener Säuger-spezies: «spurs».

Zentrum: F-Antikörper.
 Nr. 1: Hamsterleberextrakt.
 Nr. 2: Mäuseleberextrakt.
 Nr. 3: Kälberleberextrakt.
 Nr. 4: Mäuseleberextrakt.
 Nr. 5: Menschenleberextrakt.
 Nr. 6: Mäuseleberextrakt.

Seit diesem ersten Versuch haben wir wiederholt Gruppen von CBA-Mäusen mit BALB/c-Leberextrakt immunisiert und dabei mit großer Regelmäßigkeit präzipitierende Anti-F-Antikörper erhalten. Bei wöchentlicher Antigeninjektion war der Antikörper andeutungsweise nach der dritten, mit Regelmäßigkeit nach der vierten Injektion zu sehen. Wurde mit der zweiten Injektion bis 3 Wochen nach der ersten zugewartet, so war der Antikörper schon nach der dritten, eine Woche später ausgeführten Injektion nachweisbar. Auch kleinere Mengen des Antigens führten zur Antikörperbildung; so haben wir beispielsweise mit

100facher Verdünnung eines in der üblichen Weise hergestellten Extraktes präzipitierende Antikörper erhalten.

Es war zum vornherein nicht auszuschließen, daß das F-Antigen einer mikrobiellen Kontamination in unserem Versuchsmaterial entsprang. Wir wiederholten deshalb den Versuch mit frisch importierten CBA/CFW/Lac-Mäusen aus England, die wir mit Extrakten aus BALB/c-Lebern aus den USA immunisierten (siehe Material und Methoden). Wir erhielten das gleiche Ergebnis.

Die Immunisierungen erfolgten in der Regel mit chloroform-extrahierten Leberextrakten. Um den Einfluß der Chloroform-Extraktion zu prüfen, immunisierten wir 2 Gruppen von je 5 CBA-Mäusen mit BALB/c-Leberextrakt in folgender Weise:

1. nicht-chloroformierter Extrakt + Freund's Adjuvans
2. chloroformbehandelter Extrakt ohne Adjuvans

Gruppe 1 bildete präzipitierenden Anti-F-Antikörper. Gruppe 2 bildete auch nach 18 Injektionen keine Antikörper. Wir schließen daraus, daß die Chloroformbehandlung für die Antigenität nicht entscheidend war.

Die erhaltenen Antiseren reagierten auch in der Komplementbindungsreaktion und im passiven Hämagglutinationstest mit Mäuseleberextrakt. Wir wissen aber noch nicht, ob dabei der gleiche Antikörper wie bei der Gelpräzipitation im Spiel war.

2. Eigenschaften und Spezifität des F-Antigens

Wir sind zur Zeit noch nicht in der Lage, das F-Antigen chemisch zu definieren. Vorläufige Untersuchungen über einige Eigenschaften des aus Mäuseleber gewonnenen F-Antigens ergaben folgendes:

TABELLE I
Eigenschaften des Antigens

Behandlung	Ergebnis *
Lyophilisation	stabil
Dialyse	nicht dialysierbar
Schütteln mit CHCl_3	stabil
Erhitzen 50° 30 Min.	stabil
Erhitzen 65° 30 Min.	zerstört
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 50% gesättigt	nicht präzipitiert
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 60% gesättigt	präzipitiert
Elektrophoretische Beweglichkeit	wie γ -Globulin
Gelfiltration Sephadex G-100	wie bovines Serumalbumin
DEAE-Zellulose (0,05 M Phosphatpuffer pH 6,3)	nicht zurückgehalten

* Geprüft im Gelpräzipitationstest gegen ein gutes Anti-F-Serum.

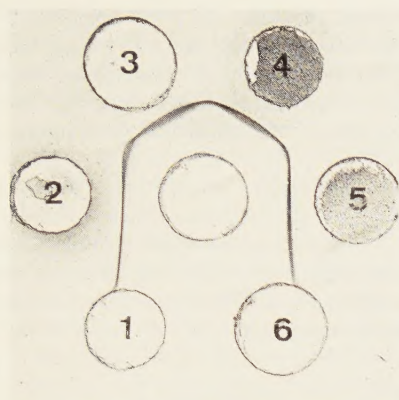


Abb. 4. Reaktion von Mäuseleberextrakt (BALB/c) mit F-Antikörpern, welche von verschiedenen Mäusestämmen gewonnen wurden.

Zentrum: Mäuseleberextrakt.

Nr. 1: Normalserum von CBA-Mäusen.

Nr. 2: F-Antikörper von CBA-Mäusen.

Nr. 3: F-Antikörper von A-Mäusen.

Nr. 4: F-Antikörper von C3H-Mäusen.

Nr. 5: F-Antikörper von A2G-Mäusen.

Spezies-Spezifität. In der Regel sind Autoantikörper nicht speziesspezifisch. Wir prüften einige gute Anti-F-Antikörper gegen eine Reihe von Leberextrakten verschiedener Tierarten. Tabelle II gibt über die Ergebnisse Auskunft.

TABELLE II

Reaktion des F-Antikörpers mit Lebern von verschiedenen Spezies

Maus	+ *	Mensch	+
Ratten	+	Schwein	+
Hamster	+	Kalb	+
Kaninchen	+	Rind	+
Katze	+	Pferd	+
Meerschweinchen	+	Huhn	(+)
Hund	+	Frosch	— *
		Thon	—

* + = Leberextrakt der betreffenden Spezies reagierte mit F-Antikörper.

— = Leberextrakt der betreffenden Spezies reagierte nicht mit F-Antikörper.

Der Anti-F-Antikörper reagierte mit allen geprüften Säugerleberextrakten. Auch Hühnerleberextrakt zeigte eine schwache, aber deutliche Reaktion. Dagegen fiel diese bei Frosch-, Thon- und Forellenleber negativ aus.

Zwischen den Leberextrakten der verschiedenen Tierarten bestand keine vollständige Identität, was in der Bildung von «spurs» zum Ausdruck kam (siehe Abb. 3).

Organ-Spezifität. Um die Organspezifität abzuklären, ließen wir bekannte Anti-F-Antiseren gegen wäßrige Extrakte verschiedener Mäuse-, Meerschweinchen- und Menschenorgane im Gelpräzipitationstest reagieren. Die Ergebnisse sind auf Tabelle III zusammengefaßt.

TABELLE III

Reaktion des F-Antikörpers mit verschiedenen Organen der Maus, des Meerschweinchen und des Menschen

	Maus	Meerschweinchen	Mensch
Leber	+ *	+	+
Niere	(+)	(+)	(+)
Milz	— *	—	—
Lunge	—	—	—
Hirn	—	—	—
Thymus	—	—	n
Pancreas	n *	—	—
Hoden	—	—	n
Darm	—	n	n
Uterus	—	n	n
Gallenblase	—	—	n
Harnblase	n	—	n
Herz	—	—	—
Skelettmuskulatur	—	—	—

* + = Reaktion mit dem F-Antikörper.

— = keine Reaktion mit dem F-Antikörper.

n = nicht geprüft.

Das Antigen schien weitgehend leberspezifisch zu sein. Schwache gekreuzte Reaktionen traten nur bei Nierenextrakten auf, sonst aber nirgends. Die Antigenität des Nierenextraktes wurde bestätigt in einem Versuch, in welchem wir CBA-Mäuse mit BALB/c-Nierenextrakt immunisierten. Alle CBA-Mäuse bildeten den F-Antikörper.

3. Genetische Konstellation bei der Induktion des Autoantikörpers

Der Anti-F-Antikörper, einmal gebildet, reagierte, wie oben erwähnt, auch mit Leberextrakten desjenigen Mäusestammes, der den Antikörper geliefert hatte. Es wäre daran nicht unmöglich gewesen, daß auch mit solchen (d. h. syngeneischen) Leberextrakten die Bildung des Antikörpers induziert werden könnte. Doch erwies sich dies als unmöglich. Wir haben insgesamt 40 CBA-Mäuse mit stammeseigenem Leberextrakt immunisiert, wobei die Mäuse bis zu 12 Injektionen erhielten, ohne daß auch nur in einer einzigen ein präzipitierender Antikörper induziert worden wäre.

Es stellte sich als nächstes die Frage, ob außer der Kombination BALB/c und CBA, die wir anfangs mehr oder weniger zufällig gewählt hatten, noch andere Stammeskombinationen zur Bildung des Anti-F-Antikörpers führen. Je 5A-, A2G-, BALB/c-, CBA-, C3H-, C57BL/6- und DBA/2-Inzuchtmäuse wurden in einer Schachbrettanordnung mit sämtlichen (also auch den eigenen) Leberextrakten immunisiert. Die Tiere erhielten insgesamt 8 Injektionen. Tabelle IV gibt Auskunft über die erhaltenen Resultate.

TABELLE IV

F-Antikörper-Induktion bei 7 Inzuchtstämmen von Mäusen

Immunisierte Tiere	Herkunft des zur Immunisierung verwendeten Leberextraktes						
	A	A2G	BALB/c	CBA	C3H	DBA	C57BL/6
A	—	—	—	+	+	+	—
A2G	—	—	—	+	+	+	—
BALB/c	—	—	—	—	—	—	—
CBA	+	+	+	—	—	—	+
C3H	+	+	+	—	—	—	+
DBA	—	—	—	—	—	—	—
C57BL/6	+ *	+ *	+ *	+ *	+ *	+ *	—

* = C57BL/6 produzierte einen Antikörper, welcher vom F-Antikörper verschieden ist (siehe Abb. 2).

+ = Sämtliche Mäuse der betreffenden Gruppe bildeten Antikörper nach höchstens 5 Injektionen des betreffenden Antigens.

— = Keine Maus der betreffenden Gruppe bildete Antikörper nach mindestens 8 Injektionen des betreffenden Antigens.

Von einer Gruppe bildeten immer entweder alle Mäuse oder keine Maus einen präzipitierenden Antikörper. Die Stämme BALB/c und DBA/2 konnten von keinem der 7 Leberextrakte zur Bildung eines präzipitierenden Antikörpers angeregt werden. Die in den Stämmen A, A2G, CBA und C3H induzierten Antikörper schienen untereinander alle gleich und identisch mit Anti-F (siehe Abb. 4). Der Stamm C57BL/6 bildete ebenfalls einen präzipitierenden Antikörper, der aber mit Anti-F nicht identisch war (siehe Abb. 2). Doch erwiesen sich

alle von C57BL/6 gebildeten Antikörper, unabhängig von dem sie induzierenden Extrakt, untereinander als gleich. In Tabelle IV fällt die große Ähnlichkeit zwischen A und A2G sowie zwischen CBA und C3H auf. Die leere Diagonale in Tabelle IV bedeutet, daß es uns in keinem Fall gelungen ist, mit einem syngeneischen Leberextrakt einen Antikörper zu induzieren.

Offenbar muß eine gewisse genetische Andersartigkeit zwischen Antigen-spende und dem zu immunisierenden Tier bestehen, damit der Antikörper gebildet wird. Um eine genauere Abgrenzung dieser Andersartigkeit vorzunehmen, züchteten wir eine Reihe von F₁-, F₂- und Rückkreuzungsmäusen und immunisierten sie mit verschiedenen Leberextrakten. Tabelle V gibt über diese Versuche Auskunft.

TABELLE V
Genetische Versuche zur Induktion von Anti-F-Antikörper

Immunisierte Tiere	Herkunft des zur Immunisierung verwendeten Leberextraktes				
	A2G	BALB/c	CBA	(A2G × CBA) F ₁	(BALB/c × CBA) F ₁
A2G	— *	—	+ *	+	n *
BALB/c	—	—	—	n	—
CBA	+	+	—	+	+
(A2G × CBA) F ₁	—	n	—	n	n
(BALB/c × CBA) F ₁	n	—	—	n	n
(A2G × CBA) F ₂	10/40 **	—	8/40	n	n
(BALB/c × CBA) F ₂	n	9/55	n	n	n
(BALB/c × CBA) F ₁ × CBA	n	11/20	n	n	n
(BALB/c × CBA) F ₁ × C3H	n	11/20	n	n	n

* — = keine der immunisierten Mäuse (mindestens 5 Tiere) bildeten Anti-F nach mindestens 8 Injektionen des betreffenden Antigens.

+ = jede immunisierte Maus (mindestens 5 Tiere) bildete Anti-F nach höchstens 5 Injektionen des betreffenden Antigens.

n = Kombination nicht geprüft.

** = Anzahl Tiere, die nach 5 Injektionen Anti-F bildeten, über Gesamtzahl der mit dem betreffenden Antigen immunisierten Tiere.

Aus Tabelle V geht hervor, daß F₁-Mäuse keine Antikörper bildeten, wenn sie mit einem der parental Stämme immunisiert wurden. Von den F₂-Mäusen hingegen bildeten ungefähr 25% den Antikörper, wenn sie mit einem der großelterlichen Extrakte immunisiert wurden. Bei Rückkreuzung mit dem einen Elter oder einem nahe verwandten Stamm und Immunisierung mit dem andern Elter bildeten 50% Antikörper. Es sieht also so aus, als ob die immunogene Determinante des F-Antigens wie auch die Unfähigkeit, auf einen gegebenen Extrakt hin mit Antikörperbildung zu antworten, wie ein dominantes Merkmal vererbt werden.

4. Fehlen eines Booster-Effekts syngeneischer Leberextrakte

Daß die Leberextrakte gewisser Mäusestämme in gewissen andern Stämmen, und namentlich im gleichen (syngeneischen) Stamm außerstande waren, die Bildung eines nachweisbaren Anti-F zu induzieren, könnte darauf beruhen, daß ihre Immunogenität nicht völlig gleich Null, sondern lediglich zu schwach war, eine primäre Immunreaktion in Gang zu bringen. Ein strengeres Kriterium der Nicht-Immunogenität läge dann vor, wenn sich zeigen ließe, daß solche Extrakte auch keinen Booster-Effekt auf eine durch einen immunogenen Extrakt schon in Gang gebrachte Immunreaktion auszuüben vermöchten. Wir immunisierten deshalb 20 CBA-Mäuse mit BALB/c-Leberextrakt. Nach 3 Injektionen (2. Injektion 21 Tage nach der ersten) hatten alle Mäuse nachweisbare Mengen von Anti-F gebildet. Mit der eingangs beschriebenen semiquantitativen Präzipitationsmethode wurden 10 Mäuse ausgewählt, welche ungefähr den gleichen Antikörper-Titer aufwiesen. Nun erhielten 5 von diesen Mäusen insgesamt 6 Booster-Injektionen im Abstand von 2 Wochen mit BALB/c-Leberextrakt ohne Freund-Adjuvans, während die 5 andern Mäuse in gleicher Weise mit CBA-Extrakt geboostert wurden. Die beiden Extrakte enthielten vergleichbare Mengen des F-Antigens. Das Ergebnis fiel nach der 6. Injektion ganz eindeutig aus: Während die mit BALB/c geboosterten Mäuse in ihrem Serum hohe Anti-F-Titer zeigten, enthielt das Serum der mit CBA geboosterten Mäuse keine präzipitierenden Antikörper mehr. Wir schließen daraus, daß der CBA-Extrakt keine Spur von Immunogenität für CBA-Mäuse aufwies.

In einem gleich angelegten Versuch konnten wir auch zeigen, daß CBA-Mäuse, welche mit BALB/c vorimmunisiert worden waren, auch mit A2G- und C57BL/6-Leberextrakten geboostert werden konnten.

5. Histopathologische Untersuchung¹

Wegen der möglichen Bedeutung, die Auto-Antikörper bei der Genese gewisser Leberaffektionen spielen könnten, interessierten uns in einer ersten Orientierung die histologischen Veränderungen in der Leber der immunisierten Tiere. Je eine Leber aus allen Kombinationen zwischen A2G, BALB/c, CBA und C57BL/6 wurde nach der 8. wöchentlichen Injektion histopathologisch untersucht. Von allen 4 Stämmen hatten wir 2 Kontrollgruppen: Eine, welche wir mit komplettem Freund'schen Adjuvans allein, und die andere, welche wir mit physiologischer NaCl-Lösung injiziert hatten. Zum Vergleich mit den Leberveränderungen wurde auch das Peritoneum histopathologisch untersucht. Die Schnittpräparate der Leber wurden jeweils aus dem rechten Leberlappen entnommen und mit Hämalaun-Eosin gefärbt. Tabelle VI gibt über die vorgefundenen histopathologischen Veränderungen Auskunft. Einzig die mit physiologischer NaCl-Lösung behandelten Mäuse zeigten keinerlei histologische Veränderungen. Bei allen übrigen Gruppen waren Veränderungen festzustellen, welche sich folgendermaßen einteilen ließen: Ölgranulome ohne Übergreifen auf das Leberparenchym, Ölgranulome mit Übergreifen auf das Leberparenchym

¹ Herrn Prof. Dr. J. Rüttner, Direktor des Histopathologischen Institutes der Universität Zürich, danken wir für die Herstellung und Beurteilung der histologischen Präparate.

und Hepatitis. Als Kriterium für eine Hepatitis nahmen wir folgende Befunde an: Über die ganze Leber verteilte Lymphozyten-, Plasmazell- und Leukozyten-Infiltrate in den portalen Feldern und Läppchen, mit Leberzellnekrosen und Aktivierung der Kupffer'schen Sternzellen. Von Stamm zu Stamm waren die Veränderungen verschieden stark ausgeprägt, innerhalb desselben Stammes aber weitgehend uniform und übereinstimmend mit den Kontrollgruppen, welche nur Freund'sches Adjuvans erhalten hatten. Ein auffälliger Zusammenhang mit der Antikörperbildung bestand nicht. Einzig bei den A2G-Mäusen hatte die antikörperbildende Maus stärkere hepatitische Veränderungen als die übrigen, was an einem größern Material nachgeprüft werden sollte. Somit scheint nur das Freund'sche Adjuvans für die Läsionen (das Ölgranulom als auch die Hepatitis) verantwortlich zu sein.

TABELLE VI

Histopathologische Veränderungen bei den Immunisationskombinationen zwischen A2G, BALB/c, CBA und C57BL/6

Immunisierter Stamm	Herkunft des zur Immunisierung verwendeten Extrakts					
	A2G	BALB/c	CBA	C57BL/6	Kompl. Fr. Adjuvans	NACI
A2G	Om	Om	Om	Om	Om	—
	He+	He+	He+++ AK-F	He+	He+	—
BALB/c	Om	Om	Om	Om	Om	—
	He+++	He+++	He+++	He+++	He+++	—
CBA	Oo	Oo	Oo	Oo	Oo	—
	AK-F	AK-F		AK-F		—
C57BL/6	Om	Om	Om	Om	Om	—
	He+	He+++	He+++	He+++	He+	—
	AK-C	AK-C	AK-C			

Oo = Ölgranulom ohne Übergreifen auf Leberparenchym.

Om = Ölgranulom mit Übergreifen auf Leberparenchym.

He = Hepatitis.

AK-F = Betreffender Leberspender bildete den F-Antikörper.

AK-C = Betreffender Leberspender bildete einen Antikörper, welcher vom F-Antikörper verschieden ist.

+ = Die Anzahl «+» kennzeichnet das relative Ausmaß der Hepatitis.

— = Keine histopathologischen Veränderungen.

Diskussion

Wir begannen unsere Versuche mit einer einfachen Fragestellung, von der wir keinerlei Komplikationen erwarteten. Wir wußten bereits, daß es Mäusestämme gibt, die in ihren Organen ein Alloantigen ε enthalten, während in anderen Stämmen dieses Antigen nicht nachweisbar ist [3]. Wir glaubten daher, es wäre leicht, durch Immunisierung ε -negativer Mäusestämme mit Organextrakten ε -positiver Stämme präzipitierende Anti- ε -Antikörper zu erhalten. Wir wählten rein willkürlich als ε -negativen Stamm CBA und als ε -positiven BALB/c, und ebenso willkürlich als Organ für die Herstellung des Antigens die Leber. Zu unserer anfänglichen Enttäuschung gelang es aber nicht, den gesuchten Anti- ε -Antikörper zu induzieren, auch nicht mit den später hinzugenommenen andern Stamm-Kombinationen.

Statt des erwarteten Allo-Antikörpers fanden wir aber präzipitierende Antikörper, die den Charakter von leberspezifischen Autoantikörpern hatten. Trotzdem also diese Antikörper mit Leberextrakten des Stammes reagierten, der sie bildete (ja mit Leberextrakten der Maus, die sie bildete), konnten sie in keinem Fall mit syngeneischen Extrakten *induziert* werden. Es ergab sich vielmehr, daß nur bestimmte Kombinationen zur Antikörperbildung führten. Hätten wir beispielsweise unsere Versuche damit begonnen, A2G mit BALB/c-Extrakten zu immunisieren, so hätten wir keine Antikörper gefunden und hätten unsere Arbeit vermutlich als negativ abgeschrieben. Nachdem wir aber einmal einen Erfolg gesehen hatten, war es relativ einfach, andere Kombinationen aufzuspüren, die zum selben Ergebnis führten. Dabei trafen wir noch auf einen andern Antikörper, der von C57BL-Mäusen nach Stimulierung mit Leberextrakten verschiedener Stämme gebildet wurde (siehe Tab. IV). Sehen wir von diesem Fall ab, den wir nicht weiter verfolgt haben, so bildeten bei geeigneter Stimulierung folgende 4 Stämme untereinander identische präzipitierende Antikörper, für die wir die Bezeichnung Anti-F vorschlagen: A, A2G, CBA und C3H. Der Antikörper Anti-F erkennt spezifisch eine Substanz, die in der Leber, in Spuren auch in der Niere, sonst aber, soweit geprüft, in keinem andern Organ und auch nicht im Plasma vorkommt (siehe Tab. III). Das F-Antigen findet sich in den Lebern der verschiedensten Tiere (siehe Tab. II). Wir folgern daraus, daß das F-Antigen ein weitgehend leberspezifischer Be-

standteil vieler Tiere ist, und daß Anti-F-Antikörper bei der Maus als Autoantikörper durch allogeneische Extrakte induziert werden können. Mäuse, die Anti-F produzierten, schienen davon keinen Nachteil zu haben. Sie machten einen gesunden Eindruck und zeigten histologisch nicht mehr Veränderungen als Mäuse des gleichen Stammes, die nur Freund's Adjuvans erhalten hatten.

In unseren Immunisierungsversuchen verhielten sich A und A2G gleich, sowohl was ihre Immunisierbarkeit wie ihre Immunogenität anbelangt. Ebenfalls identisch verhielten sich C3H und CBA. Diese Ähnlichkeiten sind weiter nicht verwunderlich, sind doch sowohl A mit A2G wie CBA mit C3H eng verwandt [8]. Dagegen verhielten sich BALB/c und DBA/2 untereinander verschieden und auch anders als A/A2G und CBA/C3H. C57BL/6 wiederum fiel in eine andere Kategorie, weil diese Mäuse einen von Anti-F verschiedenen Antikörper produzierten. Sehen wir von diesem von uns weiter nicht untersuchten Antikörper ab, so verhielten sich die C57BL/6 in bezug auf Induktion und Produktion von Anti-F genau wie BALB/c (siehe Tab. IV). Beschränken wir uns auf den Anti-F-Antikörper, so lassen sich unsere Ergebnisse durch Einführung abgekürzter Symbole stark vereinfachen:

abgekürztes Symbol	Inzuchtstämme
A	A, A2G
B	BALB/c, C57BL/6
C	CBA, C3H
D	DBA/2

In dieser abgekürzten Schreibweise sieht Tabelle IV folgendermaßen aus:

immunisierter Stamm	Leberextrakt von			
	A	B	C	D
A	—	—	+	+
B	—	—	—	—
C	+	+	—	—
D	—	—	—	—

Diese Matrix ist asymmetrisch, was für die Interpretation gewisse Schwierigkeiten bringt. Jeder Stamm ist für sich selbst nicht immunogen. Wir können auch sagen, jeder Stamm sei seinen eigenen Determinanten gegenüber tolerant. Stamm A enthält eine

immunogene Determinante, die wir als a bezeichnen möchten, der gegenüber C nicht tolerant ist. Ebenso enthält Stamm C eine immunogene Determinante c, der gegenüber A nicht tolerant ist. Die beiden Stämme B und D sind tolerant gegenüber beiden Determinanten a und c. Aber B erweist sich nur als immunogen für C; B enthält somit eine Determinante, der gegenüber C nicht tolerant ist. Analog ist D nur immunogen für A, enthält also eine Determinante, der gegenüber A nicht tolerant ist. Macht man die vereinfachende Annahme, daß die immunogenen Funktionen von A und B gegenüber C identisch sind (nämlich a), ebenso die immunogenen Funktionen von C und D gegenüber A (nämlich c), so lassen sich die Verhältnisse in folgendem Schema zusammenfassen:

Stamm	immunogene Funktion	Toleranz gegen
A	a	a
B	a	a, c
C	c	c
D	c	a, c

Störend an diesem Schema ist einzig, daß die immunogene Funktion und die Toleranz nicht direkt gekoppelt sind. Zwar hat wohl der Stamm A die immunogene Funktion a und ist gleichzeitig tolerant gegenüber a; ähnlich verhält es sich mit Stamm C und seiner immunogenen Funktion c. Wir müssen aber annehmen, daß die Stämme B und D tolerant sind gegenüber Determinanten, die sie selbst nicht als Immunogen enthalten. Das könnte entweder bedeuten, daß die Spezifität der Toleranzinduktion weniger scharf ist als diejenige der Immunogenität; so ließe sich denken, daß Stamm B eine immunogene Funktion c_a enthält, die von c hinreichend verschieden ist, um in C immunogen zu wirken, aber ähnlich genug, um Toleranz gegen c im Trägartier B zu induzieren. Oder aber die Toleranz gegenüber der Determinante c im Stamm B könnte darauf beruhen, daß in der embryonalen Phase B sowohl a wie c enthielt, daß das adulte Tier aber von c nur noch so geringe Spuren enthält, daß zwar die embryonal induzierte Toleranz erhalten bleibt, die Menge an c aber zu gering ist, um immunogen zu wirken. Eine weitere Möglichkeit wäre die, daß bei B zwar die Determinante c irgendwo im Organismus des Tieres vorkommt und die Toleranz bedingt, nicht aber im Leberextrakt, den wir zur Immunisierung verwendeten.

Wir haben bis jetzt immunogene, bzw. «tolerogene» Determinanten a und c postuliert, ohne uns zu fragen, in welcher Beziehung sie zu dem in der Gelpräzipitation definierten F-Antigen stehen. a und c könnten Varianten von F sein, derart, daß die durch sie induzierten Antikörper verschiedene Teile der gleichen Determinanten, etwa F_a und F_c erkennen. Es wäre aber auch denkbar, daß der Antikörper in jedem Fall die gleiche Struktur, nämlich F, erkennt, und daß F nach Art eines Haptens an einen Träger a oder c gekoppelt ist, also etwa F-a und F-c. Antikörper würden gegen F nur dann gebildet, wenn es an einen Träger gekoppelt ist, gegen den das betreffende Tier nicht tolerant ist. Bei dieser Hypothese erwartet man eigentlich, daß auch gegen den Träger Antikörper gebildet würden, was sich im Gelpräzipitationstest durch 'spurs' zeigen müßte. Aber diese trägerspezifischen Antikörper könnten sehr wohl in zu schwacher Konzentration vorliegen, um im relativ unempfindlichen Gelpräzipitationstest überhaupt zur Geltung zu kommen.

Die Immunisierung mit einem immunogenen Extrakt scheint eine vorbestehende Toleranz nicht zu brechen. Jedenfalls ließ sich die Immunität durch Injektion eines syngeneischen Extrakts nicht im Sinn einer anamnестischen Reaktion (Booster-Effekt) steigern. Das steht in einem gewissen Widerspruch zu den Befunden *Weigle's* [10], der bei Kaninchen mit chemisch abgewandeltem Thyreoglobulin eine Immunreaktion auslösen konnte, welche sich mit «nativem» Kaninchen-Thyreoglobulin boostern ließ. Die Interpretation *Weigle's* wurde jedoch von *Leskovitz* [4] angefochten. Danach wäre bei den Versuchen *Weigle's* nicht die Toleranz durchbrochen, sondern neue antigene Determinanten aktiviert worden. Wie dem auch sei, so ist es doch bedeutsam, daß in unseren Versuchen syngeneische Extrakte auch nach erfolgter Stimulierung mit allogeneischen Extrakten die Immunreaktion nicht weiter zu unterhalten vermochten. Sobald das kreuzreagierende Immunogen ausgeschaltet wurde, hörte die Stimulierung auf, und somit konnte es nicht zu der 'self-perpetuating reaction' kommen, wie sie bei Autoimmunkrankheiten postuliert wird.

Um unsere Kreuzungsexperimente zu deuten, müssen wir annehmen, daß immunogene und «tolerogene» Funktionen ko-dominant vererbt werden. Betrachten wir die Kreuzung $(A2G \times CBA)F_1$: Diese Tiere müssen die immunogenen Funktionen a und c und die «tolerogenen» Funktionen a und c enthalten. Weder A2G noch

CBA sollten also für diese Mäuse immunogen wirken, was wir auch bestätigt fanden (siehe Tab. V). Hingegen sollten diese Mäuse sowohl für A2G wie für CBA immunogen wirken, was sich als richtig erwies.

Auch bei der Kreuzung (BALB/c $\times$ CBA)F₁ erwarten wir die immunogenen Funktionen a und c und die «tolerogenen» Funktionen a und c. Diese F₁-Mäuse bildeten keine Antikörper nach Stimulierung mit BALB/c und CBA-Leberextrakten. Dagegen waren sie imstande, Antikörper in CBA zu induzieren, aber unfähig, Antikörper in BALB/c zu induzieren, wie zu erwarten war.

Etwas komplizierter werden die Verhältnisse bei den F₂. Hier stellt sich die Frage, ob die immunogenen und die «tolerogenen» Funktionen unabhängig voneinander vererbt werden. Wäre das der Fall, dann müßte es Mäuse geben, die mit ihrem eigenen Leberextrakt erfolgreich immunisiert werden könnten. Da wir aber bisher in keinem Fall Antikörper mit syngeneischen Extrakten haben induzieren können (siehe Tab. IV und V) ist die Annahme naheliegend, die immunogene Funktion a und die tolerogene Funktion a würden gemeinsam vererbt, ebenso die beiden Funktionen c. Es ist dann leicht einzusehen, daß von den F₂-Mäusen zwischen A2G und CBA 25% die Funktion a, 25% die Funktion c und 50% beide Funktionen enthalten. Bei Immunisierung mit A2G-Leberextrakt müssen also rund $\frac{1}{4}$ der F₂-Mäuse Antikörper bilden, bei Immunisierung mit CBA-Extrakt ebenfalls rund $\frac{1}{4}$, was wir auch gefunden haben (siehe Tab. V). Dagegen bleibt noch zu zeigen, daß es nicht die gleichen Mäuse sind, die im einen oder im andern Fall reagieren. Mit andern Worten: man müßte noch zeigen, daß jene F₂-Mäuse, die Anti-F nach Stimulierung mit A2G-Extrakten bildeten, tolerant sind gegenüber Extrakten von CBA, und umgekehrt. Versuche in dieser Richtung sind im Gange.

Die Kreuzung (BALB/c $\times$ CBA)F₂ bietet zusätzliche Schwierigkeiten, denn hier vererbt der eine Großelter eine Funktion, die zwar tolerogen, aber nicht immunogen ist. Es wäre denkbar, daß es vom genetischen Milieu abhängig ist, ob eine gegebene Funktion nur tolerogen oder tolerogen *und* immunogen wirkt. Nehmen wir aber an, daß im gegebenen Fall das genetische Milieu ohne Einfluß auf den Ausdruck von c ist, so erwarten wir bei den F₂ 25%, die sich wie BALB/c verhalten, 25% wie CBA und 50% wie die F₁-Generation. Der einzige Versuch, den wir hier verwerten können,

ist die Immunisierung von 55 (BALB/c $\times$ CBA) F_2 -Tieren mit BALB/c-Extrakt. Anti-F wurde von 9 Tieren gebildet, ein Wert, der zu niedrig, aber von den erwarteten 25% nicht signifikant verschieden ist.

Die Rückkreuzungsversuche lassen sich ähnlich deuten. So erwartet man 50%, die sich wie der Rückkreuzungselter verhalten, und 50%, die sich wie F_1 verhalten. Wir prüften die Rückkreuzung (BALB/c $\times$ CBA) F_1 $\times$ CBA bzw. die verwandte Kreuzung (BALB/c $\times$ CBA) F_1 $\times$ C3H durch Immunisieren mit BALB/c-Extrakt. In beiden Gruppen bildeten jeweils 11 von 20 Tieren den F-Antikörper. Diese Versuche sprechen auch dafür, daß sich CBA und C3H gleich verhalten (siehe Tab. V). Dasselbe wäre noch für A und A2G-Mäuse in einem analogen Versuch zu zeigen.

Wenn wir nun versuchen, ein einfaches Vererbungsschema unseren Beobachtungen zugrundezulegen, so kann es sich beim gegenwärtigen Stand unserer Untersuchungen nur darum handeln, mit den allereinfachsten Annahmen den vorliegenden Befunden gerecht zu werden. Selbstverständlich sind komplexere Zusammenhänge denkbar, und es wird wahrscheinlich notwendig werden, im Verlauf der weiteren Erforschung Modifikationen des Grundschemas vorzunehmen. Immerhin wird es interessant sein, zu sehen, wie weit ein einfaches Schema führen kann.

Die einfachste Annahme dürfte wohl sein, daß wir es mit einem einzigen Locus *F* zu tun haben, von dem es verschiedene ko-dominant vererbte Allele gibt. Entsprechend den 4 Reaktionstypen, die wir unter 7 Inzuchtstämmen festgestellt haben, können wir zurzeit 4 Allele definieren. Diese Allele bedingen die Ausbildung immunogener und «tolerogener» Funktionen. Die 4 Allele und ihre entsprechenden Funktionen sehen dann folgendermaßen aus:

Allel	immunogene Funktion	tolerogene Funktion	repräsentiert durch die Inzuchtstämme
<i>Fa</i>	a	a	A, A2G
<i>Fb</i>	a	a, c	BALB/c, C57BL/6
<i>Fc</i>	c	c	CBA, C3H
<i>Fd</i>	c	a, c	DBA

Ein solches Schema, das zweifellos die Verhältnisse stark vereinfacht, ist nur sinnvoll, wenn es zu nachprüfbaren Voraussagen über das Resultat von Kreuzungsversuchen führt. So sollte zum

Beispiel eine Kreuzung zwischen BALB/c und DBA F₁-Mäuse ergeben, deren Leberextrakt immunogen für die 4 Stämme A, A2G, CBA und C3H wäre.

Selbst wenn sich erweisen sollte, daß unsere Annahme eines einzigen *F*-Locus zu Recht besteht, so könnte es sich doch sehr wohl um einen komplexen Locus nach Art der Blutgruppen- oder Histokompatibilitäts-Loci handeln. Innerhalb eines solchen komplexen Locus könnten seltene Crossing-overs stattgefunden haben, was sich vielleicht in einer Dissoziation der immunogenen und tolerogenen Funktionen ausdrücken würde. Es wäre also denkbar, daß es einzelne Mäusestämme gibt, die ihrer eigenen immunogenen Funktion gegenüber nicht tolerant sind. Solche Mäusestämme zu finden und allfällige Autoimmunvorgänge an ihnen zu studieren, wäre eine äußerst reizvolle Aufgabe. Es sei in diesem Zusammenhang nur an die NZB-Mäuse erinnert, bei denen merkwürdige Autoimmunreaktionen auftreten [6]. Im weiteren könnte man sich auch vorstellen, daß es im Stadium einer erhöhten Leberzellregeneration in einzelnen Zellen zu Mutationen von *F^a* zu *F^c*, oder umgekehrt, kommen könnte. Wäre in der Folge noch eine erhöhte immunologische Reaktionsbereitschaft vorhanden, könnte dies evtl. zu Auto-Antikörperbildung mit einer «self-perpetuating reaction» führen.

Außer der genetischen wäre noch die chemische Basis der Immunogenität zu untersuchen. Wenn wir auch heute noch weit davon entfernt sind, die chemische Natur des *F*-Antigens zu kennen, so haben wir doch prinzipiell die Möglichkeit, durch spezifische Präzipitation mit Antikörper oder durch «Immunosorption» reine Präparate zu gewinnen. Ein Vergleich des so isolierten *F*-Antigens aus CBA-Leber mit dem entsprechenden Antigen aus A2G-Leber zum Beispiel könnte Aufschluß über die strukturellen Unterschiede geben, die für die Immunogenität verantwortlich sind.

Wenden wir unsere Aufmerksamkeit den praktischen Aspekten unserer Arbeit zu, so dürfte der Besitz eines Reagens von Nutzen sein, das spezifisch mit einem Bestandteil der Leber der verschiedensten Tiere und des Menschen reagiert. Man könnte sich denken, daß gewisse Leberschädigungen das Antigen in die Zirkulation hinübertreten lassen. Tatsächlich konnte Bodmer [1] zeigen, daß Ratten, die eine akute Thioacetamid-Vergiftung durchmachten, in ihrem Serum nachweisbare Mengen des *F*-Antigens enthielten. Für

die Medizin von noch größerer Bedeutung dürfte die Beobachtung sein, daß auch im Serum von Menschen, die an einer Knollenblätterpilz-Vergiftung litten, das Antigen nachzuweisen war [1]. Dabei ist zu bedenken, daß der Gelpräzipitationstest, wie er in diesen Versuchen zur Anwendung kam, keine empfindliche Methode des Antigennachweises ist. Es sollte technisch möglich sein, diesen Nachweis um mehrere Zehnerpotenzen empfindlicher zu gestalten, etwa durch eine radio-immunologische Methode. Vielleicht wäre uns damit eine sehr spezifische und subtile diagnostische Technik in die Hand gegeben.

Zusammenfassung

Mäuse von 7 Inzuchtstämmen (A, A2G, BALB/c, CBA, C3H, C57BL/6 und DBA/2) wurden mit wäßrigen Leberextrakten der gleichen Mäusestämme immunisiert. Dem Versuch lag eine Schachbrettanordnung zugrunde, derart, daß Mäuse aus jedem Stamm mit Extrakten aus jedem Stamm inokuliert wurden. Es zeigte sich, daß gewisse Kombinationen zur Bildung präzipitierender Antikörper führten. Stammeseigene (syngeneische) Extrakte führten weder zur Bildung präzipitierender Antikörper noch konnten sie einen vorbestehenden Antikörpertiter boostern. Dagegen induzierten Extrakte von CBA, C3H und DBA/2 in A und A2G die Bildung eines präzipitierenden Antikörpers, den wir vorläufig mit Anti-F bezeichnen. Desgleichen induzierten Extrakte von A, A2G, BALB/c und C57BL/6 die Bildung von Anti-F in CBA und C3H. Die antigene Determinante des Antigens schien dominant, das Vermögen, Antikörper gegen das Antigen zu bilden, schien rezessiv vererbt zu werden. Es konnten 4 Typen von Mäusestämmen in bezug auf Immunogenität und «Tolerogenität» unterschieden werden. Wir postulierten deshalb vorläufig einen Locus mit 4 Allelen, welcher die Ausbildung des F-Antigens steuert.

Das F-Antigen ist organspezifisch und kommt in den Lebern sämtlicher geprüfter Säuger, inklusive Mensch, vor. Es findet sich auch in der Leber des den Anti-F-Antikörper produzierenden Tieres; demnach ist Anti-F ein Autoantikörper. Histologisch waren in der Leber immunisierter Mäuse entzündliche Veränderungen feststellbar. Diese waren nicht mit den präzipitierenden Antikörpern korreliert und fanden sich auch in Mäusen, die nur Freund's Adjuvans erhalten hatten.

Summary

Mice of 7 inbred strains (A, A2G, BALB/c, CBA, C3H, C57BL/6, and DBA/2) were immunized with aqueous liver extracts of the same strains. Each strain was split into 7 groups immunized with liver extracts of the different strains. Some combinations yielded precipitating antibody. Syngeneic liver extracts neither induced precipitating antibody nor could they boost a preexisting

antibody level. CBA, C3H and DBA/2 liver extracts were capable of inducing a precipitating antibody in A and A2G whereas A, A2G, BALB/c and C57BL/6 liver extracts induced the same antibody in CBA and C3H. We propose to call this antibody anti-F. The immunogenic determinant of the antigen was inherited like a dominant character, the capacity to form antibody against the F-antigen like a recessive character. We could distinguish 4 types of strains with respect to immunogenicity and 'tolerogenicity'. We therefore postulate provisionally the existence of one genetic locus with 4 alleles governing the F-antigen.

The F-antigen proved organ specific and was present in the livers of all mammals tested so far (including man). As the F-antigen was also found in the antibody producing animal, anti-F behaved like an autoantibody. Histological changes found in animals immunized with liver extracts and Freund adjuvant were similar to those found in the control groups which received Freund adjuvant only.

Literatur

1. Bodmer, A.: (in Vorbereitung).
2. Fahey, J. L. and McKelvey, E. M.: Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody-agar plates. *J. Immunol.* 94: 84-90 (1965).
3. Klein, P. A. and Lindenmann, J.: Further studies on the soluble ε -antigen of the mouse. *Path. Microbiol.* 28: 698-703 (1965).
4. Leskowitz, S.: Tolerance. *Ann. Rev. Microbiol.* 21: 157-180 (1967).
5. Lindenmann, J. and Klein, P. A.: Mouse tissue isoantigen detectable by immunoprecipitation. *Proc. Soc. exp. Biol., N.Y.* 117: 446-449 (1964).
6. Shulman, S.; Yantorno, C.; Soanes, W. A.; Gonder, M. J. and Witebsky, E.: Studies on organ specificity. XVI. Urogenital tissues and autoantibodies. *Immunology* 10: 99-113 (1966).
8. Staats, J.: Standardized nomenclature for inbred strains of mice, third listing. *Cancer Res.* 24: 147-168 (1964).
9. Uhlenhuth, P. und Steffenhagen, K.: Die biologische Eiweißdifferenzierung mittels der Agargelpräzipitation unter Berücksichtigung der Technik; in: W. Kollé und A. von Wasserman's Hb. d. pathogenen Mikroorganismen, 3. Band, Kap. V, pp. 257-336 (Jena 1913).
10. Weigle, W. O.: The production of thyreoditis and antibody following injection of unaltered thyreoglobulin without adjuvant into rabbits previously stimulated with altered thyreoglobulin. *J. exp. Med.* 122: 1049-1062 (1965).
11. Witebsky, E.: Organ specific autoantibodies. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 124: 29-36 (1965).

Curriculum vitae

Als Sohn von Dr. med. Gondini Fravi bin ich am 2. Juni 1940 in Heimenschwand BE geboren, wo ich die Primar- und Sekundarschule absolvierte. Anschließend besuchte ich das Internat Lyceum Alpinum in Zuoz GR und schloß meine Mittelschulausbildung mit der eidgenössischen Maturitätsprüfung ab. An der Universität Zürich absolvierte ich von 1959 bis 1965 das gesamte Studium der Medizin. Im Herbst 1965 bestand ich das eidgenössische Staatsexamen. Seither bin ich am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Zürich tätig.

